

Jéssica Andrade da Silva

**PAPEL DA TEMPORIZAÇÃO NORADRENÉRGICA  
NA REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE MELATONINA PELA  
GLÂNDULA PINEAL EM CULTURA: CARACTERÍSTICAS  
FUNCIONAIS E MECANISMOS DE AÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla Neto

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo  
2013

## RESUMO

Silva JA. Papel da temporização noradrenérgica na regulação da síntese de melatonina pela glândula pineal em cultura: características funcionais e mecanismos de ação. [dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

A melatonina, hormônio sintetizado pela glândula pineal durante a fase escura, apresenta ritmo circadiano e sazonal de secreção. Uma vez que a glândula pineal não é uma estrutura oscilatória autônoma, sua produção é regulada principalmente pela noradrenalina (Nor) liberada na fase escura. Seu ritmo circadiano de expressão gênica é sustentado pelos genes relógio, e na cultura padrão de glândula pineal as glândulas não expressam modificação rítmica funcional. Para mimetizar o padrão fisiológico de liberação da noradrenalina na cultura de glândula pineal, desenvolvemos uma cultura temporizada com noradrenalina. Assim, esse estudo visa avaliar a manutenção da maquinaria do relógio circadiano da glândula pineal mediante cultura seguindo os protocolos agudo e temporizado com noradrenalina, assim como, investigar qual a via noradrenérgica envolvida nessa manutenção. Para o estudo *in vivo*, os ratos foram sacrificados circadianamente. Para o estudo *in vitro*, foram sacrificados na transição da fase clara para a escura e suas glândulas submetidas à cultura por 72 horas sob as condições: controle (sem Nor), agudo (Nor  $10^{-6}$  nas primeiras 12h das últimas 24h), temporizado (desde o início da cultura: 12h presença/12h ausência da Nor  $10^{-6}$ ), temporizado com adição de prazosin (inibidor  $\alpha_1$ ), temporizado com adição de propranolol (inibidor  $\beta$  adrenérgico) e temporizado com adição dos dois bloqueadores combinados. Nas últimas 24 horas as glândulas e seus meios de cultura foram coletados a cada 3 horas. Realizou-se a análise da expressão gênica do RNAm por qPCR dos genes *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Rev-erba*, *Dbp* e *Aanat*, a atividade enzimática da AANAT e a quantificação dos conteúdos de melatonina nos meios pelo método UHPLC. *In vivo* todos os genes analisados apresentaram padrão rítmico de expressão. À medida que foram colocados na condição *in vitro* controle e agudo, os ritmos observados foram abolidos. A manutenção da ritmicidade circadiana, apesar das diferentes acrofases, foi observada no grupo temporizado. Além disso, a temporização também foi capaz de promover aumento na duração do pico de atividade enzimática, assim como aumentar o conteúdo de melatonina produzida pelas glândulas. A adição de Prazosin na cultura temporizada gerou a redução das amplitudes de expressão, e em alguns casos o ritmo foi abolido. Já a adição de Propranolol, associado ou não com Prazosin, aboliu completamente qualquer variação circadiana existente nos genes analisados. Sendo assim, viu-se que a temporização noradrenérgica da cultura foi capaz de manter a expressão dos componentes do relógio circadiano na glândula pineal, resultando em melhora da fisiologia da glândula, e aumento da síntese de melatonina. Viu-se também que a ação temporizada da noradrenalina se dá principalmente via receptor  $\beta$ , potencializado pela via do receptor  $\alpha_1$ . Sendo assim a cultura temporizada com noradrenalina se mostra importante para evitar a disrupção da variação rítmica encontrada na cultura padrão de glândula pineal.

**Palavras-chave:** Glândula pineal. Melatonina. Noradrenalina. Temporização. Genes relógio. Ritmicidade.

## ABSTRACT

Silva JA. Role of norepinephrine synchronization on melatonin synthesis regulation of pineal gland culture: function and action mechanisms. [Masters thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Melatonin, a hormone synthesized by the pineal gland on the dark phase, shows a circadian and seasonal rhythm of secretion. Since the mammal's pineal gland is not an autonomous oscillator, the melatonin production requires the release of norepinephrine (NE) on the dark phase. The circadian gene expression in pineal gland is sustained by clock genes. In the standard pineal culture, the gland is extracted and maintained on culture for 48 hours prior to treatment with NE. Under this condition, the glands do not express any functional rhythmic variation. To mimic the physiological pattern of NE release in the pineal gland culture, we develop a synchronized culture with NE. The aim of this study was to investigate the maintenance of circadian clock genes expression within rat pineal gland under acute and NE-synchronized culture. Also we have investigated by which noradrenergic pathway this maintenance occurs. For the in vivo experiments, the animals were sacrificed of a circadian way. For the in vitro, the rats were sacrificed on the transition of light to dark phase, and the glands were submitted to the culture for 72 h under conditions: control (without NE), acute (NE  $10^{-6}$  for 12h after 48h), synchronized (since the begin of the culture: 12h presence/12h absence of NE), synchronized with Prazosin ( $\alpha_1$  blocker), synchronized with Propranolol ( $\alpha$   $\beta$  blocker) and synchronized with both drugs. In the last 24h of culture, the glands and medium were collected every 3h. The mRNA expressions of *Aanat*, *Bmall*, *Cry1*, *Cry2*, *Dbp*, *Per1*, *Per2* and *Rev-erba* were investigated by qPCR, as well as the AANAT activity and melatonin content by UHPLC method. All genes analyzed showed circadian rhythm expression in vivo. However, under in vitro, control and acute condition, every rhythm observed before were abolished. The presence of circadian rhythmicity, despite the differences of acrophase, was found in all genes in the synchronized group. Further, the synchronization was also able to improve the peak duration of the AANAT activity, as well as increase the melatonin content. The prazosin addition in the synchronized culture reduced the gene expression, and in some cases the rhythm was abolished. On the other hand, the propranolol addition, combined or not with prazosin, abolished every rhythmic expression variation in analyzed genes. Thus, the synchronization was able to maintain the circadian clock expression in the pineal gland, improving the melatonin synthesis. Also, the synchronized norepinephrine acts by  $\beta$  receptor, and the  $\alpha_1$  receptor pathway potentiates this. In conclusion, the synchronized culture method showed itself as a useful approach to avoid the disruption of rhythmic variations that are present in the standard culture.

**Keywords:** Pineal gland. Melatonin. Norepinephrine. Synchronization. Clock genes. Rhythmicity.

# 1 INTRODUÇÃO

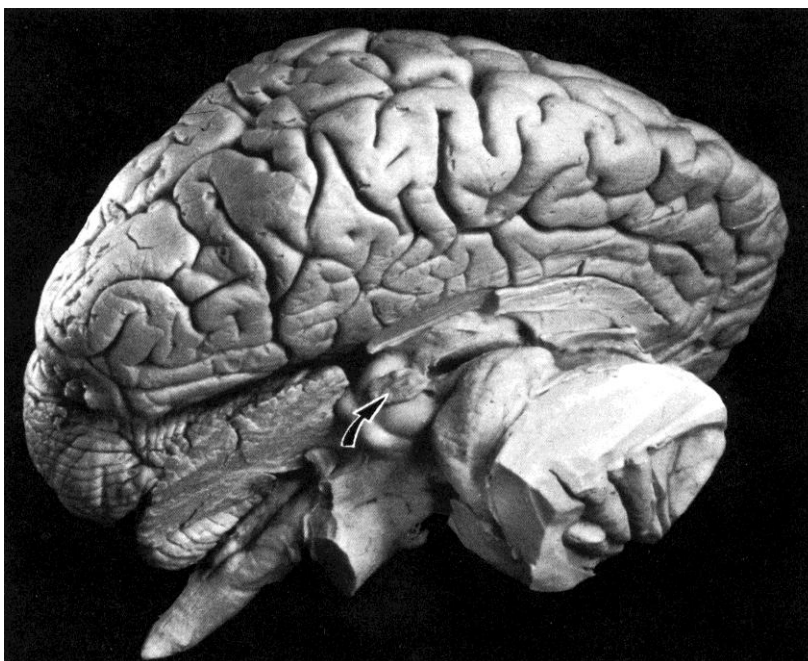
## 1.1 A glândula pineal

### 1.1.1 Anatomia e histologia

A glândula pineal, também conhecida como órgão pineal, participa da organização temporal de ritmos biológicos, regulando processos fisiológicos fundamentais, como a regulação endócrina da reprodução, regulação do ciclo sono/vigília, sistema imunológico, entre outros. Essa glândula é uma estrutura epitalâmica localizada dorsalmente à região caudal do diencefalo e deriva-se de células neuroectodérmicas desenvolvendo-se a partir de uma evaginação dorsal do teto da parede do terceiro ventrículo <sup>(1,2)</sup>.

A localização da glândula pineal varia de acordo com a espécie. Em humanos esse órgão se encontra na região central do cérebro, no epitalamo, entre as comissuras habenular e posterior <sup>(2)</sup>.

**Figura 1** – Localização anatômica da glândula pineal em humanos.



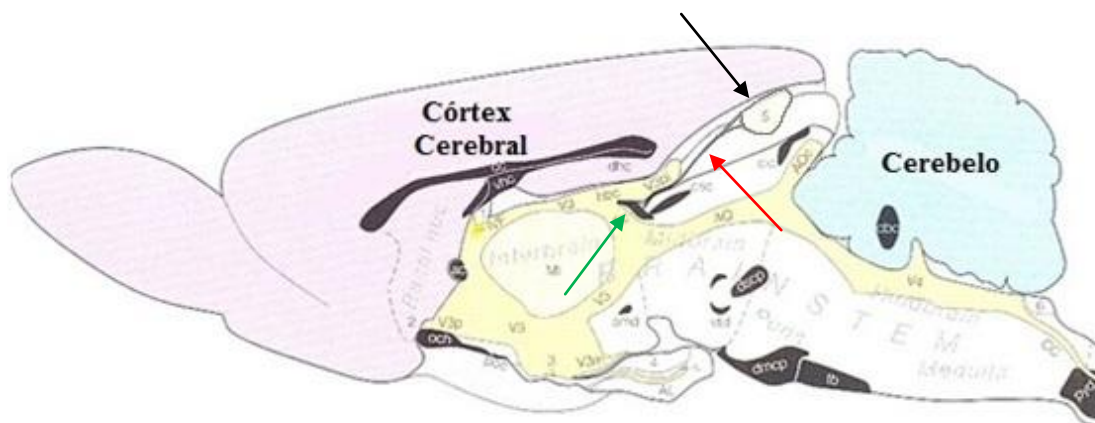
A glândula pineal é encontrada na região central do cérebro, no epitalamo, entre as comissuras habenular e posterior

Fonte: Vollrath L (1981)<sup>(3)</sup>.

Já em roedores, como em ratos, a glândula pineal é dividida em três partes: pineal profunda, pedúnculo pineal e pineal superficial (Figura 2). A pineal profunda está localizada

entre as comissuras posterior e habenular, delimitando uma região ventricular conhecida como recesso pineal. Da porção dorsal da pineal profunda emerge o pedúnculo pineal que se comunica com a pineal superficial<sup>(4)</sup>.

**Figura 2** – Localização anatômica da glândula pineal em roedores.



Representação da localização da glândula pineal no encéfalo de ratos e das três porções da glândula pineal de roedores: pineal superficial (seta preta), pedúnculo pineal (seta vermelha) e pineal profunda (seta verde).  
Fonte: Modificado de Swanson LW (1998)<sup>(5)</sup>.

Independentemente da espécie animal a glândula pineal é composta principalmente por pinealócitos (estrutura responsável pela síntese de melatonina), além de apresentar células gliais, das quais algumas são astrócitos (célula responsável por secretar entre outras substâncias, o angiotensinogênio)<sup>(2, 6)</sup>, e tecido conjuntivo (para sua sustentação).

### 1.1.2 Melatonina: molécula e biossíntese

A glândula pineal de mamíferos é responsável pela produção e secreção do hormônio melatonina durante a noite. A produção apenas noturna caracteriza uma variação diária típica dos ritmos circadianos, ou seja, a produção ocorre ritmicamente a cada 24 horas<sup>(7-9)</sup>.

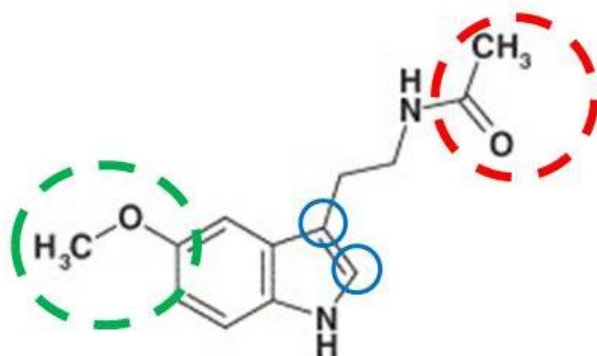
Esse hormônio é ubíquo, podendo ser encontrado em quase todos os seres vivos, de procariotos a eucariotos<sup>(10)</sup>. Muitas são as funções atribuídas a ele como, por exemplo: a capacidade de sequestrar radicais hidroxilas<sup>(11)</sup>, de mobilizar mecanismos reparadores do DNA, de regular diretamente atividades de enzimas, além de atuar no metabolismo oxidativo (sendo um importante antioxidante), no transporte de elétron da mitocôndria e nos processos de apoptose<sup>(10)</sup>.

A molécula melatonina apresenta em sua estrutura química um grupamento metóxi no carbono 5 e um grupamento acil ligado ao nitrogênio do grupo amina. Essas duas estruturas

permitem que essa molécula apresente características anfifílicas, ou seja, esse hormônio é hidrofílico e lipofílico. Devido a essa propriedade, a melatonina pode ser encontrada em todos os compartimentos do organismo.

Além disso, os carbonos 2 e 3 do anel pirrólico possuem alta capacidade de doar elétrons, permitindo então que essa molécula apresente uma alta capacidade anti-oxidante sendo, portanto, um dos agentes anti-oxidantes naturais mais importantes <sup>(12)</sup> (Figura 3).

**Figura 3** – Fórmula estrutural da molécula melatonina.



### **MELATONINA (N-acetil-5-metoxi-triptamina)**

A molécula melatonina apresenta um grupamento metóxi (círculo verde) e grupamento acetil (círculo vermelho), responsáveis pela anfifilicidade da molécula. Além disso, há os carbonos 2 e 3 (círculos azuis) que possuem alta capacidade de doar elétrons, garantindo um alto poder anti-oxidante a esse hormônio.

Fonte: Modificado de Hardeland et al. (2006)<sup>(13)</sup>.

A melatonina pode agir de várias formas: no interior da própria célula que a produz (ações intracrinadas diretas) ou sair desta e exercer ações autócrinas, parácrinas e endócrinas mediadas ou não por receptores de membrana (MT1, MT2 e MT3) <sup>(8, 14, 15)</sup> e/ou nucleares (RZR/ROR) <sup>(10, 16-19)</sup>.

Tanto anatomicamente quanto funcionalmente, a glândula pineal varia de acordo com a espécie. Em peixes e anfíbios a glândula é diretamente fotorreceptora, em aves a glândula pineal apresenta função fotorreceptora e secretória e em mamíferos a pineal não é exibida fotossensibilidade <sup>(2)</sup>.

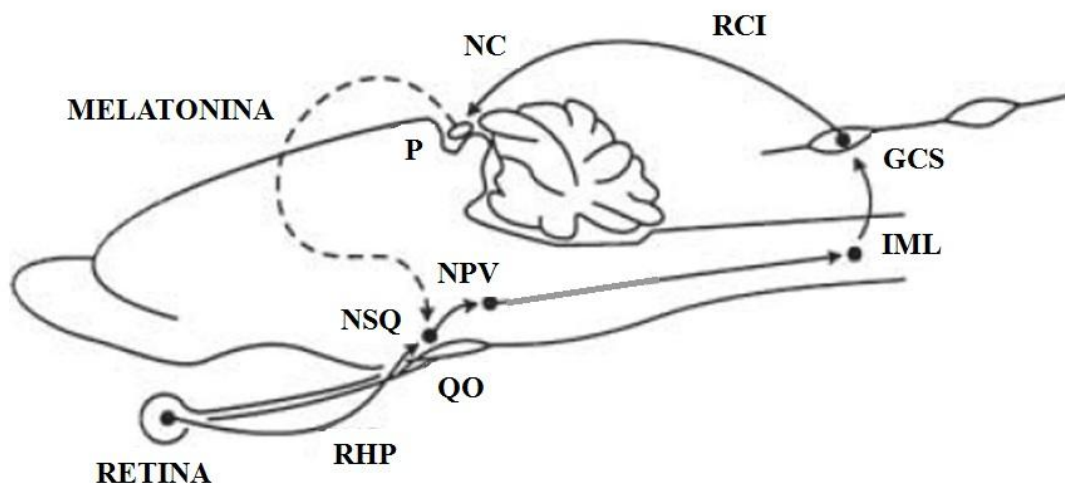
Sabendo-se dessa característica, se nota que a sincronização da produção de melatonina ao ciclo de iluminação ambiental em mamíferos depende de uma via neural que culmina na inervação simpática da glândula pineal <sup>(8, 20)</sup>. Essa via neural regulatória se inicia nos núcleos paraventriculares do hipotálamo (PVH), passando pela coluna intermédia lateral da medula espinhal (IML), de onde partem ramificações pré-ganglionares que seguem até o gânglio cervical superior (GCS). A partir dessa estrutura se projetam fibras simpáticas que,

através do nervo conário e do ramo carotídeo interno inervam a glândula pineal, culminando na liberação de noradrenalina no interstício glandular, o que leva à síntese de melatonina<sup>(8, 21, 22)</sup>.

Esse sistema é temporizado pelo relógio central, o núcleo supraquiasmático (NSQ), resultando na produção circadiana da melatonina. Como o NSQ está sincronizado através de uma via retino-hipotalâmico ao ciclo de iluminação ambiental, a produção de melatonina se dá exclusivamente durante a noite<sup>(23, 24)</sup>.

Portanto, a produção desse hormônio é regulada principalmente pela inervação simpática da glândula pineal via fibras noradrenérgicas originadas no gânglio cervical superior<sup>(1, 21, 25)</sup>. E a melatonina, em si, age como sinalizadora e agente sincronizadora nos núcleos supraquiasmáticos<sup>(2)</sup> (Figura 4).

**Figura 4** – Representação da via retino hipotalâmica pineal (RHP).



(RHP): projeção da via retino-hipotalâmica; (NSQ): núcleo supraquiasmático; (QO): quiasma óptico; (NPV): núcleo paraventricular; (IML): Coluna intermédio-lateral da medula espinal; (GCS): gânglios cervicais superiores; (RCI): ramos carotídeos internos; (NC): nervos conários; (P): glândula pineal.

Fonte: Modificado de Klein DC (1993)<sup>(26)</sup>.

A produção de outros indóis pineais, como a 5-hidroxitriptofano (5-HT), a serotonina, o ácido 5-hidroxi-indolacético e a N-acetilserotonina, também é regulada predominantemente pela inervação simpática da glândula pineal<sup>(1, 25)</sup>. Porém, a síntese desses indóis e da melatonina pode também ser regulada por aferências provenientes de áreas diencefálicas específicas, por sistemas peptidérgicos (com participação, por exemplo, do neuropeptídeo Y) e por polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) / polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária (PACAP)<sup>(27-29)</sup>. Recentemente foi demonstrado que outras substâncias também podem modular a síntese de melatonina, como a angiotensina e a insulina

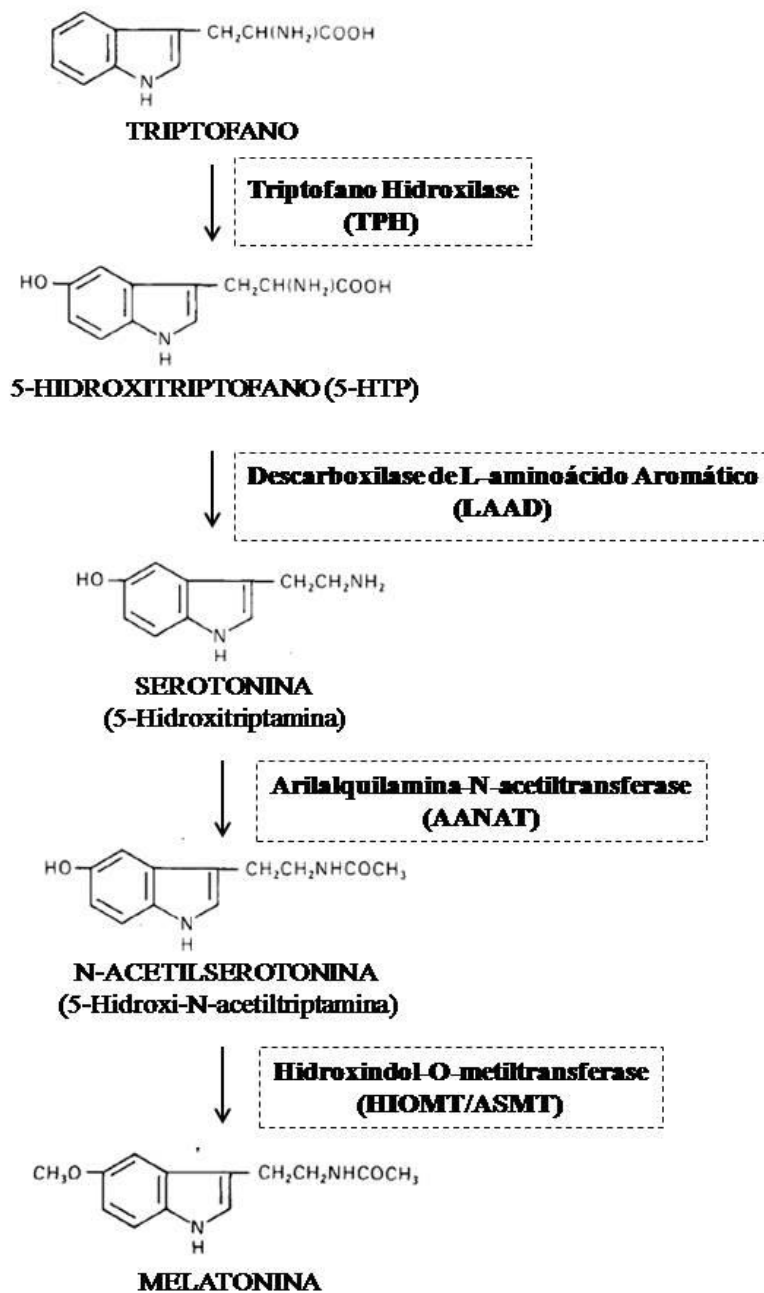
que agem estimulando a glândula à síntese, e o glutamato que age como um inibidor nessa modulação <sup>(6, 30-32)</sup>.

A noradrenalina quando liberada no interstício glandular interage com os receptores noradrenérgicos. Uma vez ativado, o adrenoceptor  $\beta_1$  promove, através da mediação da proteína G estimulatória, o aumento da quantidade intracelular de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) pela ativação da enzima adenilato ciclase (AC). Esse mecanismo é potencializado pela ativação do adrenoceptor  $\alpha$  ( $\alpha_{1B}$ ). Quando isso acontece, sua proteína Gq ativa a fosfolipase C que hidrolisa os fosfoinositídeos de membrana produzindo diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP3). O IP3 se liga em seus receptores do retículo endoplasmático induzindo a liberação de cálcio dessas organelas, cuja concentração intracelular aumenta. Esse aumento pode ser caracterizado por um pico seguido de um platô. O cálcio e o DAG são importantes, pois serão os responsáveis por ativar a proteína quinase C (PKC) potencializando o aumento de AMPC. O cálcio intracelular e o AMPC são de fundamental importância na síntese de melatonina, pois irão participar da ativação da enzima AANAT, como será descrito posteriormente (arilalquilamina-N-acetiltransferase, a enzima passo limitante na síntese deste hormônio) <sup>(33-37)</sup>.

A produção da melatonina inicia-se com o aminoácido triptofano que é hidroxilado pela triptofano hidroxilase (TPH) dando origem ao 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Esse por sua vez é descarboxilado pela enzima descarboxilase de L-aminoácido aromático (LAAD), formando a serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT). A serotonina sofre ação da arilalquilamina-N-acetiltransferase (AANAT ou NAT), transferindo um grupamento acetil para a serotonina, tendo como produto a N-acetilserotonina (NAS). Essa última sofre ação da enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), que substituindo o hidrogênio do grupamento hidroxila do carbono 5 do grupo indólico por um grupamento metil forma a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) <sup>(25)</sup> (Figura 5). De forma clássica, a AANAT estabiliza sua atividade enzimática quando é fosforilada pela PKA ativada pelo AMPC, ocorrendo assim sua ligação com a proteína 14-3-3, formando um complexo AANAT/14-3-3. Essa associação impede que a AANAT seja metabolizada por um mecanismo de proteólise proteossomal <sup>(38-40)</sup>. Essas enzimas possuem características próprias e complementares que promovem uma melhor regulação da síntese de melatonina.



Figura 5 – Via bioquímica de síntese da melatonina.



Representação dos indóis envolvidos na via de síntese da melatonina e dos pontos de atuação das enzimas atuantes no processo.

Fonte: Modificado Arendt J (1995) <sup>(2)</sup>.

#### 1.1.2.1 Triptofano hidroxilase (TPH)

Como já mencionado anteriormente, a primeira enzima da via é a TPH. Na glândula pineal do rato, essa enzima apresenta um ritmo circadiano de atividade, com valores mais elevados na fase noturna, fazendo com que a síntese de 5-hidroxitriptofano concentre-se nesse

intervalo. Esse aumento da atividade de cerca de 2 vezes durante a noite se deve, principalmente, a mecanismos pós-transcricionais induzidos por estimulação noradérgica (ativação das vias do AMPc e PKA), promovendo então a fosforilação da proteína CREB que por sua vez promove transcrição da enzima TPH. A transcrição gênica inicia-se com a ligação do CREB fosforilado ao sítio do elemento responsivo ao AMPc (sítio CRE) do gene<sup>(33, 34, 37, 41, 42)</sup>. Após a transcrição e tradução, a enzima é então ativada promovendo o aumento da 5-HTP, que quando descarboxilada pela descarboxilase de L-aminoácido aromático dá origem à serotonina, principal substrato da AANAT<sup>(25)</sup>.

#### 1.1.2.2 Arilalquilamina-N-acetiltransferase (AANAT)

A terceira enzima da via, a AANAT, é responsável pela acetilação da serotonina. Seus mecanismos de regulação variam de acordo com a espécie animal, sendo diferentes em humanos, ovinos, bovinos e roedores. Em ratos essa enzima está presente em diferentes tecidos, sendo encontrada principalmente na hipófise, no núcleo supraquiasmático, na retina e na pineal<sup>(33)</sup>.

Durante muitos anos tentou-se clonar esse gene sem sucesso. Porém durante a década de 90, mais de um grupo de pesquisadores conseguiram realizar tal feito, de forma a revolucionar os estudos envolvendo glândula pineal e melatonina. Após a clonagem desse gene foi possível estudá-lo melhor.

O gene da *Aanat* em ratos possui 4 exons e em sua região promotora há uma sequência CRE-like, um CCAAT Box invertido (ligação de C/EBP), sítio de ligação para a proteína ativadora 1 (AP-1) e uma região denominada PIRE que se liga ao CRX (*Cone-rod homeobox protein*). Viu-se que a expressão gênica da *Aanat* apresenta variação rítmica de transcrição, sendo maior durante a noite, assim como, a atividade de seu correspondente protéico. Estudos mostraram que esse aumento seria de até 150 vezes durante a noite em ratos. Além disso, puderam também concluir que esse gene compunha uma nova família dentro da superfamília das acetiltransferases, aparecendo mais tardiamente na evolução, provavelmente no mesmo período em que a melatonina surgiu como sinal fotoquímico<sup>(33, 43-45)</sup>. A partir da clonagem desse gene, foi possível verificar a sua existência também em outros tecidos, como na retina e no testículo, porém com uma transcrição de menor amplitude<sup>(33)</sup>.

A ativação da transcrição do gene da *Aanat* se dá através da fosforilação do CREB pelo AMPc após estímulo adrenérgico, sendo assim é possível notar também o ritmo circadiano da fosforilação do CREB. O pCREB se liga ao sítio CRE da região promotora

acima mencionado, estimulando a transcrição do gene<sup>(44, 45)</sup>. Além desse, outros fatores de transcrição como AP-1, Fra2 e CRX complementam a ação do pCREB<sup>(46)</sup>.

Além de estimuladores da transcrição também existem os inibidores, como a proteína ICER (*inducible cAMP early repressor*) que compete com o pCREB pela ligação ao sítio CRE. Uma vez que ICER se ligue ao sítio CRE, há inibição da transcrição da *Aanat*. O ICER é estimulado noradrenergicamente, e portanto, também participa da regulação fina da enzima passo limitante da via de síntese da melatonina<sup>(45, 47)</sup>.

Sendo assim, concluiu-se que a redução do AMPc, e o aumento da proteína ICER são mecanismos importantes para a inibição da transcrição da *Aanat*. Além disso, foi visto que na primeira metade da noite os níveis de pCREB são mais elevados reduzindo, portanto, o efeito inibitório do ICER. Em 2003, um trabalho mostrou que a noradrenalina promove também a translocação do PSP1 (uma fosfatase) do citoplasma para o núcleo. Essa enzima então realizaria a rápida desfosforilação da pCREB, fazendo com que seus níveis caíssem na segunda metade da noite. Essa queda, promove a redução abrupta da relação entre pCREB e ICER, privilegiando a ação do ICER que reduz a transcrição da *Aanat*<sup>(46, 48)</sup>.

Na estrutura protéica da AANAT há motifs A e B que a caracteriza como uma acetiltransferase. Apresenta também vários sítios de fosforilação, como o sítio para PKC e sítio para caseína quinase II. Além desses, há também o sítio RRXT/S (sítio de proteína quinase dependente de nucleotídeo cíclico) na porção N-terminal e C-terminal, de forma a mostrar a importância do AMPc como regulador dessa enzima<sup>(45)</sup>.

Com o aumento dos níveis de AMPc devido ao estímulo noradrenérgico durante a noite, nota-se o aumento da atividade enzimática da AANAT nesse período<sup>(49)</sup>. Em trabalhos posteriores viu-se que mesmo após certo tempo de estímulo adrenérgico, baixos níveis de AMPc ainda permanecem no interior da célula para a manutenção da atividade da AANAT<sup>(50)</sup>.

Nesse mesmo trabalho, especulou-se que o desligamento da atividade da AANAT seria devido à queda abrupta de AMPc. Havendo exposição à luz durante a fase escura, os níveis de atividade dessa enzima reduziriam de maneira muito rápida por conversão de AANAT funcional em AANAT não funcional através de um processo chamado proteólise proteossomal<sup>(49, 51)</sup>. Essa queda do AMPc ainda não podia ser explicada na década dos anos 70. Porém, anos mais tarde, verificou-se que através do mecanismo da Nor/AMPc/PKA, os níveis da transcrição da fosfodiesterase 4B2 (PDE4B2) eram aumentados. Essa enzima tem sua transcrição, tradução e ativação disparada por estímulo adrenérgico, dessa forma foi possível concluir que na glândula pineal essa molécula apresenta maiores valores durante a

noite. A PDE4B2 é responsável pela desativação do AMPc (hidrolisando-o à AMP) e consequente inativação da PKA e redução da atividade da AANAT. Havendo, portanto, uma alça de *feedback* negativo, onde o aumento do AMPc pela noradrenalina promove o aumento da PDE4 que por sua vez promove a redução dos níveis de AMPc, inativação de PKA e redução da AANAT. Essa enzima realiza, portanto, a regulação fina da atividade da enzima passo limitante da síntese de melatonina <sup>(52)</sup>.

Como já mencionado anteriormente, a AANAT apresenta sitio de fosforilação para PKC. Essa proteína quinase contribui para o aumento da atividade da AANAT após estímulo noradrenérgico. Isso se deve ao fato de que a PKC fosforila a AANAT no resíduo de Thr29, aumentando a sua estabilidade, estado de fosforilação e, conseqüentemente, estado de ativação. Além disso, a PKC promove maior estabilidade à enzima, uma vez que essa fosforila em resíduo Thr29, criando um consenso de ligação do motif 14-3-3, facilitando a formação do complexo AANAT/14-3-3<sup>(53)</sup>. Esse complexo é formado classicamente após a fosforilação da AANAT por PKA, mas como demonstrado por Choi e colaboradores (2004)<sup>(53)</sup>, também pode ser por fosforilação por PKC. Quando a AANAT não é fosforilada, não há a formação do complexo com a 14-3-3 e a enzima é então rapidamente degradada por proteólise proteossomal. Estudos posteriores mostraram que a proteína AANAT é degradada via porção N-terminal por proteólise proteossomal e a leucina na porção N-terminal teria um papel fundamental na regulação da degradação protéica <sup>(54)</sup>.

Um importante regulador do complexo AANAT/14-3-3 é o nível de AMPc. Quando esse diminui, a pAANAT se dissocia do complexo, e sua reassociação é bloqueada pela ação das fosfatases (que desfosforilam a pAANAT, transformando-a em AANAT novamente). Essa enzima não ligada é então destruída <sup>(39)</sup>. Em suma, a associação com a proteína 14-3-3 impede que a AANAT seja metabolizada por um mecanismo de proteólise proteossomal <sup>(39, 40, 52)</sup>.

### 1.1.2.3 Hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT/ASMT)

A hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), última enzima da via de síntese de melatonina é uma enzima controversa e até hoje de difícil compreensão. Muitas questões ainda estão em aberto acerca dessa proteína, inclusive a sua nomenclatura: atualmente é chamada de ASMT (*N-Acetylserotonin-O-methyltransferase*), especificando sua ação sobre a metilação da NAS. Essa enzima age sobre a N-acetilserotonina (NAS), transformando-a em

melatonina. A atividade da enzima HIOMT/ASMT no período noturno apresenta um aumento de 1,5 vezes, enquanto o seu RNAm tem um aumento de 2 vezes. O ritmo circadiano do RNAm da HIOMT/ASMT é dependente da estimulação adrenérgica, da ativação do receptor  $\beta$ - adrenérgico e do aumento na concentração de AMPc. Já a regulação do ritmo de atividade da enzima HIOMT/ASMT parece ser dependente de eventos pós-transcricionais induzidos por neurotransmissores que aumentem o cálcio <sup>(55, 56)</sup>, não estando diretamente relacionada com a noradrenalina assim como a transcrição.

## 1.2 Ritmicidade e genes relógio

Como já mencionado, a produção de melatonina apresenta variação circadiana. Sua produção é sincronizada ao dia e à noite, assim como às estações do ano pela informação luminosa transmitida pela via retino-hipotalâmica (RHP) e núcleos supraquiasmáticos (NSQ - também chamado de “relógio central”). Além de participar ativamente do controle da síntese da melatonina, o NSQ expressa genes relógio, que por definição são um grupo de genes que se autorregulam por alças de retroalimentação positivas e negativas em um período aproximado de 24 h. São genes relógio os genes: *Bmal1* (*Brain and muscle ARNT-like1*), *Clock* (*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*), *Rev-erba* (*Reverse strand of the c-erba gene*), *Per* (*Period*) 1, 2 e 3, *Cry* (*Chrytochrome*) 1 e 2. Também existem os genes controlados pelo relógio como o *Dbp* (*D-box binding protein*). Esses genes são responsáveis por sustentar o sistema circadiano de expressão gênica <sup>(23)</sup>.

A princípio acreditava-se que tais genes encontravam-se apenas nos núcleos supraquiasmáticos (NSQs), porém com o avanço dos estudos viu-se que são encontrados em muitas regiões cerebrais, assim como nos núcleos paraventricular e arqueado, *pars tuberalis*, bulbo olfatório e na glândula pineal. Da mesma forma, podem ser encontrados em órgãos e tecidos periféricos, como fígado, coração, rins, músculos, tecido adiposo, entre outros <sup>(7, 24, 56)</sup>. Na glândula pineal de ratos em regime de 12h:12h claro/escuro, viu-se que a expressão rítmica de *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* e *Cry2* <sup>(57)</sup> está presente.

### 1.2.1 Alça de retroalimentação dos genes relógio

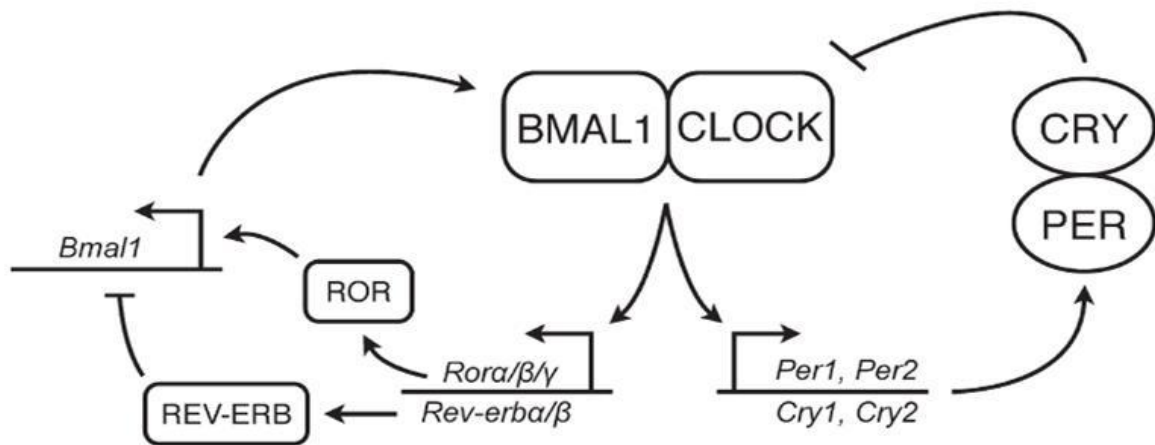
Para que a ritmicidade seja mantida esses genes estão envolvidos em alças de retroalimentação. Os genes *Clock* e *Bmal1* são transcritos e traduzidos. Em seguida ocorre a heterodimerização das proteínas CLOCK e BMAL1 (PAS-bHLH), formando o complexo

CLOCK/BMAL1, que por sua vez irá se ligar às *E-boxes* (sequência específica de DNA encontrada na região promotora) dos genes *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, ativando a transcrição dos mesmos <sup>(7, 9, 58)</sup>. Consequentemente, haverá a tradução de suas proteínas. Quando as proteínas PER1 e PER2 se acumulam no citoplasma formam um complexo negativador juntamente com proteínas CRY1 e CRY2, que entra no núcleo impedindo assim a ação transcricional do complexo CLOCK/BMAL (Figura 6).

Como proteínas fundamentais neste processo de ritmicidade temos as REV-ERB $\alpha$  e REV-ERB $\beta$ , importantes na formação das oscilações circadianas de RNAm do *Bmal1*. Quando não há REV-ERB $\alpha$  nota-se o aumento de RNAm de *Bmal1*, e da expressão de diversos outros genes relógio no NSQ e tecidos periféricos. Sendo assim, a proteína REV-ERB $\alpha$  age como um inibidor de transcrição, uma vez que se liga ao sítio responsivo ao elemento ROR (RORE) existente no gene *Bmal1* interrompendo a sua transcrição. A REV-ERB $\beta$  também funciona como uma proteína repressora. O sistema relógio até funciona sem as REV-ERBs, mas estas são as responsáveis pela sintonia fina da ritmicidade <sup>(7, 8, 59)</sup> (Figura 6).

Além das REV-ERBs, há também as RORs (*Retinoic acid receptor-related orphan receptor*), ambas pertencentes à família dos receptores órfãos nucleares. Assim como no gene *Rev-erb*, a transcrição de *Rora* é ativada pelo complexo CLOCK/BMAL. Como já mencionado, a REV-ERB $\alpha$  é capaz de reprimir a expressão de *Bmal1*. Opostamente, o ROR $\alpha$  se liga ao sítio responsivo ao elemento ROR (RORE) do gene *Bmal1* sendo, portanto, capaz de promover a transcrição desse gene <sup>(9, 59)</sup> (Figura 6). Sendo assim, nota-se a importância dessas duas proteínas para a regulação fina do funcionamento do relógio, uma maquinaria complexa.

**Figura 6** – Representação do processo regulatório dos principais genes relógio.



As proteínas BMAL1 e CLOCK se heterodimerizam no citoplasma, migram ao núcleo e se ligam positivamente à região promotora dos genes *Per* e *Cry*. A transcrição e tradução desses genes ocorre, e no citoplasma há o vínculo entre CRY e PER, que irão agir negativamente sobre o complexo BMAL1/CLOCK, exercendo portanto, ação regulatória sobre a própria expressão. Além disso, o complexo BMAL1/CLOCK também se liga à região promotora de *Rora/β/γ* e *Rev-erba/β*. Esses, por sua vez, serão transcritos e traduzidos. As RORs agem sobre a expressão de *Bmal1* de forma estimulatória, enquanto as REV-ERBs agem sobre a expressão de *Bmal1* de forma inibitória.

Fonte: Modificado de Duguay e Cermakian (2009)<sup>(9)</sup>.

Outras proteínas secundárias, que são controladas por genes do relógio, complementam o *feedback* e aumentam a amplitude do ritmo, como a proteína DBP (proteína ligante do elemento D albumina). O complexo BMAL1/CLOCK aumenta a transcrição do gene *Dbp* através de uma E-box no seu segundo íntron mostrando, portanto, que o gene *Dbp* é controlado pelos genes do relógio<sup>(58)</sup>.

A proteína BMAL1 apresenta em sua estrutura um domínio bHLH (*heliz-loop-helix*) e um domínio PAS. Esses domínios permitem a heterodimerização entre BMAL1 e CLOCK<sup>(7)</sup>.

Os genes *Pers* apresentam domínios PAS (importante para interações proteína-proteína) e CLD (domínio de localização citoplasmática que ajuda a manter a proteína no citoplasma)<sup>(58)</sup>. Além disso, sabe-se também que esse gene apresenta um sítio CRE de forma que a fosforilação de CREB induzida pela PKA causa a transcrição de *Per1*<sup>(60, 61)</sup>.

De acordo com o exposto acima, muitas são as formas e mecanismos de regulação e manutenção dos ritmos circadianos, envolvendo inclusive, mecanismos transcricionais e pós transcricionais. Assim sendo, é de suma importância que haja um balanço entre a síntese e a degradação dos RNAs dos genes envolvidos nesse processo<sup>(7, 9)</sup>.

### 1.2.2 A glândula pineal e os genes relógio: uma relação com a noradrenalina

Sabe-se que muitos genes relógio como, por exemplo: *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Bmall*, *Rev-erba* e *Clock* são expressos na glândula pineal de roedores<sup>(23, 62-65)</sup>. Em camundongos, os genes relógio presentes na glândula pineal possuem um papel importante que está relacionado com o controle do *timing* da atividade da AANAT<sup>(62)</sup>. Dessa forma, na espécie em questão podemos imaginar a importância da atuação sincronizada dos mesmos, modulando a produção do hormônio pineal.

Sabendo-se da importância da noradrenalina na sincronização da glândula pineal, faz-se interessante conhecer a função e a relação desse hormônio com a regulação desses genes relógio que sustentam o sistema circadiano.

Vários trabalhos envolvendo noradrenalina e os genes relógio foram realizados. Um deles foi o realizado pela Simonneaux et al. (2004)<sup>(23)</sup>, no qual foi possível verificar através da técnica de hibridização *in situ* que na glândula pineal de ratos Wistar existe a variação rítmica circadiana de vários genes relógio, como: *Per1*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2* (que apresentam valores maiores na fase escura) e do gene *Bmall* (que apresenta valores maiores na fase clara). Além disso, de acordo com seu trabalho após a injeção de isoproterenol (agonista  $\beta$  adrenérgico) intraperitonealmente nos animais, os genes *Per1* e *Cry2* apresentaram aumento na regulação da expressão gênica sugerindo um controle disparado pela noradrenalina. O mesmo não foi visto para os genes *Per3* e *Cry1*, que apresentariam, portanto, algum outro mecanismo de regulação<sup>(23)</sup>.

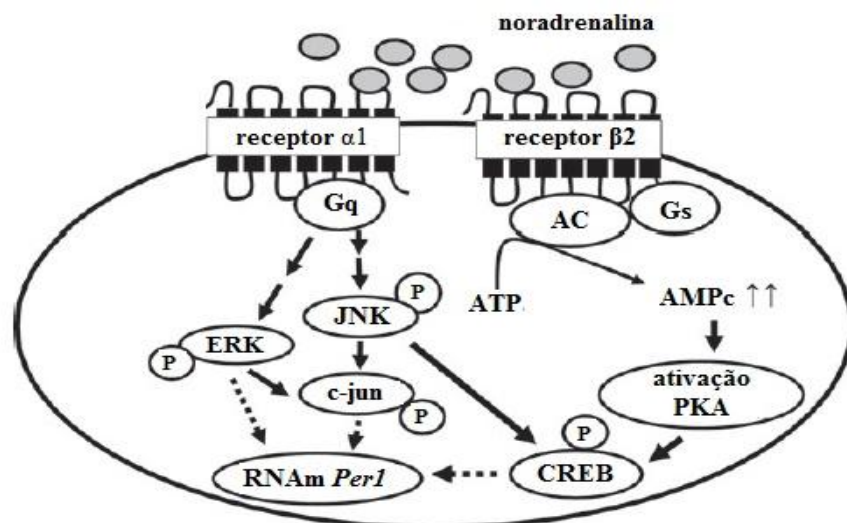
Outro trabalho também com objetivo de avaliar a relação existente entre genes relógio e noradrenalina foi realizado em 2009 por Wongchitrat e colaboradores. Assim como no trabalho supracitado, houve o sacrifício circadiano dos animais, para obtenção das glândulas pineais a fim de se verificar a expressão gênica por hibridização *in situ*. Sendo possível observar que em hamster sírio havia a expressão rítmica dos genes *Per1*, *Cry2*, *Bmall*, *Rev-erba* e *Aanat*. Também nesse trabalho os genes *Per1*, *Cry2* e *Aanat* apresentaram maiores valores na fase escura, enquanto que *Bmall* durante a fase clara. O *Rev-erba* mostrou expressão oposta à de *Bmall*. Além disso, também foi realizada injeção intraperitoneal de propranolol (antagonista inespecífico de receptores  $\beta$  noradrenérgicos) nos animais durante a fase clara. Após 3 horas desse tratamento, viu-se que as expressões de *Per1*, *Cry2* e *Aanat* tiveram a amplitude de expressão reduzida, enquanto *Bmall* e *Rev-erba* não foram afetados pelo tratamento<sup>(64)</sup>. Assim, esse trabalho corrobora o supracitado uma vez que se pôde notar variação rítmica na expressão de *Cry2*, *Per1* e *Aanat* em ambos os trabalhos. A regulação



dessa expressão é mediada pela ativação ou não dos receptores  $\beta$  adrenérgicos *in vivo*, levando a crer que apenas para esses genes a transcrição é disparada e regulada pela noradrenalina.

Além desses experimentos realizados *in vivo*, há outros trabalhos realizados *in vitro* estabelecendo relação entre a noradrenalina e a expressão gênica dos genes relógio. Um deles foi um estudo realizado por Sugimoto et al. (2011) <sup>(66)</sup>. Nesse trabalho usou-se cultura primária de astrócitos medulares de ratos. As células foram então desafiadas agudamente com noradrenalina (1  $\mu$ M), coletadas e foram feitas análises de PCR em tempo real. A noradrenalina foi capaz de promover o aumento da expressão de *Per1* logo na primeira hora (voltando a seus níveis basais em menos de 3h), além de aumentar a expressão de *Cry1*, *Cry2* e *Bmal1*. Não exerceu efeito algum sobre *Per2* e *Clock*. Verificou-se também que o aumento visto na expressão gênica de *Per1* deu-se após a ativação dos receptores  $\alpha_1$  e  $\beta_2$ . Em seguida, Sugimoto e colaboradores, verificaram que após a ativação do receptor  $\alpha_1$  houve o recrutamento de ERK e JNK por fosforilação. A JNK fosforilou a c-jun. Já ERK e c-jun agiram de alguma forma ainda não conhecida na expressão de *Per1*. Após a ativação de  $\beta_2$ , através de uma proteína G estimulatória a adenilato ciclase foi ativada, aumentando AMPc e consequentemente ativando a PKA que promoveu a fosforilação do CREB. O pCREB por sua vez se ligou ao sítio CRE do gene *Per1* levando à sua transcrição (Figura 7) <sup>(66)</sup>.

**Figura 7** – Esquema da regulação da expressão de *Per1* estimulado pela noradrenalina em astrócitos medulares.



A expressão gênica do gene *Per1* é mobilizada após a ativação dos receptores  $\alpha_1$  e  $\beta_2$ . A ativação dos mesmos pela noradrenalina leva a ativação de vias de sinalizações que culminam na expressão gênica do *Per1*, mostrando a relevância da noradrenalina na expressão desse gene. ERK: quinase regulada por sinal extracelular; JNK: quinase N-terminal c-jun; AC: adenilato ciclase; ATP: trifosfato de adenosina; AMPc: adenosina 3',5' – monofosfato cíclico; PKA: proteína quinase A; CREB: proteína de ligação responsiva à AMPc. Fonte: Modificado de Sugimoto et al. (2011) <sup>(66)</sup>.

Em trabalho recente, usando uma metodologia de cultura diferente da tradicional, foram usadas glândulas antes do período de 48 horas necessárias para a completa degeneração dos terminais simpáticos. Ou seja, nessa preparação havia terminais em degeneração e, conseqüentemente, liberação de noradrenalina. Nesse trabalho, Wongchitrat e colaboradores (2011) <sup>(67)</sup> mostraram que as ritmicidades dos genes *Per2*, *Bmal1* e *Rev-erba* se mantinham, porém as de *Per1* e da *Aanat* atenuaram-se logo nas primeiras 24 h. Ainda nesse trabalho, a estimulação da cultura com Isoproterenol (um agonista  $\beta$  adrenérgico) foi capaz de aumentar a expressão de *Per1*, porém de mais nenhum outro gene. Ao estimular essa mesma cultura com fenilefrina (agonista  $\alpha$  adrenérgico) notou-se o mesmo efeito, porém com menor amplitude. Dessa forma concluíram que apenas o gene *Per1* teria a sua ritmicidade dependente da estimulação noradrenérgica, sendo ativados tanto adrenoceptores  $\alpha$  como  $\beta$ .

Como demonstrado acima, a cultura utilizada pecava pelo fato de não ter excluído o sinal noradrenérgico vindo dos terminais simpáticos em degeneração. A técnica de cultura mais habitual é a desenvolvida por Parfitt e colaboradores (1975) <sup>(68)</sup>. Nessa metodologia, as glândulas são extraídas dos animais e colocadas em um meio de cultura apropriado com temperatura e pH também adequados, permanecendo em cultura por 48 h antes de sua utilização em qualquer procedimento experimental. Este tempo é considerado necessário para que ocorra a degeneração completa dos terminais simpáticos. Após esse período a glândula pode ser considerada uma preparação exclusivamente pós-sináptica. Em geral, após 48 h as glândulas são estimuladas com noradrenalina e após 5 h da estimulação, são coletadas e as análises funcionais correspondentes são feitas.

Entretanto, em uma condição de cultura padrão as glândulas deixam de expressar qualquer modificação funcional rítmica, uma vez que, sabidamente, as pineais de mamíferos não são estruturas oscilatórias autônomas. Pelo contrário, sua oscilação circadiana é estritamente dependente de estruturas neurais centrais e impostas à glândula através principalmente da inervação simpática noradrenérgica <sup>(62, 69)</sup>. Portanto, com a justificativa de tentar mimetizar condições funcionais das glândulas em cultura às condições que se observa *in vivo*, desenvolvemos um novo modelo de cultura, em que se administra noradrenalina ao meio de cultura de forma rítmica, alternando períodos de 12 h de estimulação com 12 h sem estimulação <sup>(31, 32)</sup>. Pretendendo-se assim, manter um padrão rítmico circadiano que pelo menos quanto à disponibilidade de noradrenalina fosse semelhante ao encontrado no animal *in vivo*, reconstruindo-se *in vitro* um dia e uma noite induzidos. Esse protocolo de estimulação revelou que a temporização da cultura pela noradrenalina per se foi capaz de aumentar tanto a

síntese da melatonina quanto as atividades das enzimas TPOH e da AANAT, sem aumentar a transcrição dos RNAs mensageiros das mesmas, sugerindo uma regulação pós-traducional das atividades destas proteínas <sup>(31, 32)</sup>.

Sabendo-se que a noradrenalina é ritmicamente liberada no interstício glandular, e que exerce um importante papel na manutenção da ritmicidade da glândula e sua produção de hormônio, a cultura temporizada pode ser importante para a melhora dessas alterações promovidas pela falta de ritmicidade. Podendo ser capaz, portanto, de manter a variação rítmica da expressão dos genes relógio, importantes para a manutenção do relógio circadiano. Sendo assim, também é importante validar a ação do tratamento temporizado com noradrenalina, além de se investigar quais são os mecanismos e possíveis vias envolvidas.

## 6 CONCLUSÃO

Baseando-se no visto neste trabalho, é possível dizer que a expressão dos genes relógios, um assunto controverso atualmente, não possui uma oscilação autônoma sendo dependente de estimulação noradrenérgica. Porém, não apenas a presença da noradrenalina seria suficiente para a regulação da maioria dos genes, se faz necessária a sua presença de forma temporizada. Isso explicaria muitos trabalhos que afirmam que a expressão de alguns dos genes relógio não são dirigidos pela noradrenalina: falta a temporização. Os dados vistos aqui, a estimulação aguda pela noradrenalina não foi capaz de manter o ritmo desses genes na glândula pineal, reafirmando a importância dessa temporização para o estudo de glândula pineal *in vitro*. Ou seja, a presença da noradrenalina é fundamental, mas o elemento temporização é imprescindível para uma melhor condição da glândula.

Além disso, essa temporização da estimulação noradrenérgica se dá via receptores  $\alpha_1$  e  $\beta$ , sendo que a cascata de sinalização mediada pelo receptor  $\alpha_1$  parece ser a responsável pela regulação fina da expressão gênica, e responsável pelas variações vistas entre os grupos agudo e temporizado.

## REFERÊNCIAS\*

1. Kappers JA. The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1960;52:163-215.
2. Arendt J. *Melatonin and the Mammalian Pineal Gland.* London: Chapman & Hall; 1995.
3. Vollrath L. *The Pineal Organ.* Heidelberg: Springer-Verlag; 1981.
4. Moller M. Fine structure of the pinealopetal innervation of the mammalian pineal gland. *Microsc Res Tech.* 1992 May 1;21(3):188-204.
5. Swanson LW. *Brain Maps: structure of the brain.* 2<sup>a</sup> ed. Amsterdã: Elsevier Science B. V.; 1998.
6. Baltatu O, Afeche SC, Jose dos Santos SH, Campos LA, Barbosa R, Michelini LC, et al. Locally synthesized angiotensin modulates pineal melatonin generation. *J Neurochem.* 2002 Jan;80(2):328-34.
7. Dardente H, Cermakian N. Molecular circadian rhythms in central and peripheral clocks in mammals. *Chronobiol Int.* 2007;24(2):195-213.
8. Skene DJ, Arendt J. Human circadian rhythms: physiological and therapeutic relevance of light and melatonin. *Ann Clin Biochem.* 2006 Sep;43(Pt 5):344-53.
9. Duguay D, Cermakian N. The crosstalk between physiology and circadian clock proteins. *Chronobiol Int.* 2009 Dec;26(8):1479-513.
10. Reiter RJ. Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol.* 1995 Oct;16(4):383-415.
11. Tan DX, Poeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, et al. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett.* 1993 Jun 15;70(1-2):65-71.
12. Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem.* 2002 Feb;2(2):181-97.
13. Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006 Mar;38(3):313-6.
14. Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ, Masana MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci.* 2003 Sep 1;8:d1093-108.

---

\*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

15. Witt-Enderby PA, Bennett J, Jarzynka MJ, Firestine S, Melan MA. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci.* 2003 Apr 4;72(20):2183-98.
16. Garcia-Maurino S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Rafii-El-Idrissi M, Sanchez-Margalet V, Goberna R, et al. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol.* 1997 Jul 15;159(2):574-81.
17. Kim KH, Woo HY, Lim SW. Association Study of a Serotonin Receptor 2A Gene - 1438A/G Polymorphism and Anxiety-Related Traits. *Psychiatry Investig.* 2008 Dec;5(4):244-6.
18. Steinhilber D, Brungs M, Werz O, Wiesenberg I, Danielsson C, Kahlen JP, et al. The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol Chem.* 1995 Mar 31;270(13):7037-40.
19. Wiesenberg I, Missbach M, Kahlen JP, Schrader M, Carlberg C. Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res.* 1995 Feb 11;23(3):327-33.
20. Moore RY. Neural control of pineal function in mammals and birds. *J Neural Transm Suppl.* 1978(13):47-58.
21. Cipolla Neto J, Afeche SC. Glândula Pineal: fisiologia celular e função. Wajchenberg BL, editor. São Paulo: Roca; 1992.
22. Moore RY, Speh JC, Card JP. The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol.* 1995 Feb 13;352(3):351-66.
23. Simonneaux V, Poirel VJ, Garidou ML, Nguyen D, Diaz-Rodriguez E, Pevet P. Daily rhythm and regulation of clock gene expression in the rat pineal gland. *Brain Res Mol Brain Res.* 2004 Jan 5;120(2):164-72.
24. Masson-Pevet M. [Melatonin in the circadian system]. *J Soc Biol.* 2007;201(1):77-83.
25. Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia.* 1989 Oct 15;45(10):922-32.
26. Klein DC. The mammalian melatonin rhythm-generating system. Wetterberg L, editor. Oxford: Pergamon Press; 1993.
27. Cipolla-Neto J, Bartol I, Seraphim PM, Afeche SC, Scialfa JH, Peracoli AM. The effects of lesions of the thalamic intergeniculate leaflet on the pineal metabolism. *Brain Res.* 1995 Sep 11;691(1-2):133-41.
28. Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev.* 2003 Jun;55(2):325-95.

29. Cipolla-Neto J, Skorupa AL, Ribeiro-Barbosa ER, Bartol I, Mota SR, Afeche SC, et al. The role of the retrochiasmatic area in the control of pineal metabolism. *Neuroendocrinology*. 1999 Feb;69(2):97-104.
30. Yamada H, Ogura A, Koizumi S, Yamaguchi A, Moriyama Y. Acetylcholine triggers L-glutamate exocytosis via nicotinic receptors and inhibits melatonin synthesis in rat pinealocytes. *J Neurosci*. 1998 Jul 1;18(13):4946-52.
31. Garcia RA, Afeche SC, Scialfa JH, do Amaral FG, dos Santos SH, Lima FB, et al. Insulin modulates norepinephrine-mediated melatonin synthesis in cultured rat pineal gland. *Life Sci*. 2008 Jan 2;82(1-2):108-14.
32. Peliciari-Garcia RA, Marcal AC, Silva JA, Carmo-Buonfiglio D, Amaral FG, Afeche SC, et al. Insulin temporal sensitivity and its signaling pathway in the rat pineal gland. *Life Sci*. 2010 Jul 31;87(5-6):169-74.
33. Borjigin J, Wang MM, Snyder SH. Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature*. 1995 Dec 21-28;378(6559):783-5.
34. Klein DC, Sugden D, Weller JL. Postsynaptic alpha-adrenergic receptors potentiate the beta-adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Jan;80(2):599-603.
35. Chik CL, Ho AK, Klein DC. Alpha 1-adrenergic potentiation of vasoactive intestinal peptide stimulation of rat pinealocyte adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate: evidence for a role of calcium and protein kinase-C. *Endocrinology*. 1988 Feb;122(2):702-8.
36. Sugden D, Klein DC. Activators of protein kinase C act at a postreceptor site to amplify cyclic AMP production in rat pinealocytes. *J Neurochem*. 1988 Jan;50(1):149-55.
37. Vanecek J, Sugden D, Weller J, Klein DC. Atypical synergistic alpha 1- and beta-adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology*. 1985 Jun;116(6):2167-73.
38. Klein DC. The pineal gene expression party: who's the surprise guest? *Endocrinology*. 2007 Apr;148(4):1463-4.
39. Klein DC, Ganguly S, Coon S, Weller JL, Obsil T, Hickman A, et al. 14-3-3 Proteins and photoneuroendocrine transduction: role in controlling the daily rhythm in melatonin. *Biochem Soc Trans*. 2002 Aug;30(4):365-73.
40. Chik CL, Arnason TG, Dukewich WG, Price DM, Ranger A, Ho AK. Histone H3 phosphorylation in the rat pineal gland: adrenergic regulation and diurnal variation. *Endocrinology*. 2007 Apr;148(4):1465-72.
41. Sugden D, Vanecek J, Klein DC, Thomas TP, Anderson WB. Activation of protein kinase C potentiates isoprenaline-induced cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes. *Nature*. 1985 Mar 28-Apr 3;314(6009):359-61.

42. Roseboom PH, Klein DC. Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol Pharmacol*. 1995 Mar;47(3):439-49.
43. Coon SL, Roseboom PH, Baler R, Weller JL, Namboodiri MA, Koonin EV, et al. Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science*. 1995 Dec 8;270(5242):1681-3.
44. Roseboom PH, Coon SL, Baler R, McCune SK, Weller JL, Klein DC. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology*. 1996 Jul;137(7):3033-45.
45. Klein DC, Roseboom PH, Coon SL. New light is shining on the melatonin rhythm enzyme: the first postcloning view. *Trends Endocrinol Metab*. 1996 Apr;7(3):106-12.
46. Maronde E, Pfeffer M, Olcese J, Molina CA, Schlotter F, Dehghani F, et al. Transcription factors in neuroendocrine regulation: rhythmic changes in pCREB and ICER levels frame melatonin synthesis. *J Neurosci*. 1999 May 1;19(9):3326-36.
47. Ho AK, Price DM, Terriff D, Chik CL. Timing of mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation in the rat pineal gland. *Mol Cell Endocrinol*. 2006 Jun 27;252(1-2):34-9.
48. Koch M, Mauhin V, Stehle JH, Schomerus C, Korf HW. Dephosphorylation of pCREB by protein serine/threonine phosphatases is involved in inactivation of Aanat gene transcription in rat pineal gland. *J Neurochem*. 2003 Apr;85(1):170-9.
49. Klein DC, Weller JL. Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science*. 1970 Sep 11;169(3950):1093-5.
50. Klein DC, Buda MJ, Kapoor CL, Krishna G. Pineal serotonin N-acetyltransferase activity: abrupt decrease in adenosine 3',5'-monophosphate may be signal for "turnoff". *Science*. 1978 Jan 20;199(4326):309-11.
51. Klein DC, Weller JL. Rapid light-induced decrease in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Science*. 1972 Aug 11;177(4048):532-3.
52. Kim JS, Bailey MJ, Ho AK, Moller M, Gaildrat P, Klein DC. Daily rhythm in pineal phosphodiesterase (PDE) activity reflects adrenergic/3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate induction of the PDE4B2 variant. *Endocrinology*. 2007 Apr;148(4):1475-85.
53. Choi BH, Chae HD, Park TJ, Oh J, Lim J, Kang SS, et al. Protein kinase C regulates the activity and stability of serotonin N-acetyltransferase. *J Neurochem*. 2004 Jul;90(2):442-54.
54. Huang Z, Liu T, Borjigin J. N-terminal residues regulate proteasomal degradation of AANAT. *J Pineal Res*. 2010 Apr;48(3):290-6.
55. Ribelayga C, Garidou ML, Malan A, Gauer F, Calgari C, Pevet P, et al. Photoperiodic control of the rat pineal arylalkylamine-N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression and its effect on melatonin synthesis. *J Biol Rhythms*. 1999 Apr;14(2):105-15.



56. Ribelayga C, Pevet P, Simonneaux V. Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rat pineal gland. *Brain Res.* 1997 Nov 28;777(1-2):247-50.
57. Engel L, Lorenzkowski V, Langer C, Rohleder N, Spessert R. The photoperiod entrains the molecular clock of the rat pineal. *Eur J Neurosci.* 2005 Apr;21(8):2297-304.
58. Okamura H, Yamaguchi S, Yagita K. Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res.* 2002 Jul;309(1):47-56.
59. Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, et al. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron.* 2004 Aug 19;43(4):527-37.
60. Hinoi E, Ueshima T, Hojo H, Iemata M, Takarada T, Yoneda Y. Up-regulation of per mRNA expression by parathyroid hormone through a protein kinase A-CREB-dependent mechanism in chondrocytes. *J Biol Chem.* 2006 Aug 18;281(33):23632-42.
61. Viyoch J, Matsunaga N, Yoshida M, To H, Higuchi S, Ohdo S. Effect of haloperidol on mPer1 gene expression in mouse suprachiasmatic nuclei. *J Biol Chem.* 2005 Feb 25;280(8):6309-15.
62. Fukuhara C, Yamazaki S, Liang J. Pineal circadian clocks gate arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression in the mouse pineal gland. *J Neurochem.* 2005 Apr;93(1):156-62.
63. Namihira M, Honma S, Abe H, Tanahashi Y, Ikeda M, Honma K. Daily variation and light responsiveness of mammalian clock gene, Clock and BMAL1, transcripts in the pineal body and different areas of brain in rats. *Neurosci Lett.* 1999 May 21;267(1):69-72.
64. Wongchitrat P, Felder-Schmittbuhl MP, Phansuwan-Pujito P, Pevet P, Simonneaux V. Endogenous rhythmicity of Bmal1 and Rev-erb alpha in the hamster pineal gland is not driven by norepinephrine. *Eur J Neurosci.* 2009 May;29(10):2009-16.
65. Wu T, Dong Y, Yang Z, Kato H, Ni Y, Fu Z. Differential resetting process of circadian gene expression in rat pineal glands after the reversal of the light/dark cycle via a 24 h light or dark period transition. *Chronobiol Int.* 2009 Jul;26(5):793-807.
66. Sugimoto T, Morioka N, Sato K, Hisaoka K, Nakata Y. Noradrenergic regulation of period1 expression in spinal astrocytes is involved in protein kinase A, c-Jun N-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase activation mediated by alpha1- and beta2-adrenoceptors. *Neuroscience.* 2011 Jun 30;185:1-13.
67. Wongchitrat P, Felder-Schmittbuhl MP, Govitrapong P, Phansuwan-Pujito P, Simonneaux V. A noradrenergic sensitive endogenous clock is present in the rat pineal gland. *Neuroendocrinology.* 2011;94(1):75-83.
68. Parfitt A, Weller JL, Klein DC, Sakai KK, Marks BH. Blockade by ouabain or elevated potassium ion concentration of the adrenergic and adenosine cyclic 3',5'-monophosphate-induced stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Mol Pharmacol.* 1975 May;11(3):241-55.

69. Yoshikawa T, Yamazaki S, Menaker M. Effects of preparation time on phase of cultured tissues reveal complexity of circadian organization. *J Biol Rhythms*. 2005 Dec;20(6):500-12.
70. Afeche SC, Barbosa R, Scialfa JH, Terra IM, Cassola AC, Cipolla-Neto J. Effects of the blockade of high voltage-activated calcium channels on in vitro pineal melatonin synthesis. *Cell Biochem Funct*. 2006 Nov-Dec;24(6):499-505.
71. Deguchi T, Axelrod J. Control of circadian change of serotonin N-acetyltransferase activity in the pineal organ by the beta--adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972 Sep;69(9):2547-50.
72. Cornelissen G, Halberg F, Stebbings J, Halberg E, Carandente F, Hsi B. Chronobiometry with pocket calculators and computer systems. *Ric Clin Lab*. 1980 Apr-Jun;10(2):333-85.
73. Bai L, Zimmer S, Rickes O, Rohleder N, Holthues H, Engel L, et al. Daily oscillation of gene expression in the retina is phase-advanced with respect to the pineal gland. *Brain Res*. 2008 Apr 8;1203:89-96.
74. Wang GQ, Du YZ, Tong J. Daily oscillation and photoresponses of clock gene, Clock, and clock-associated gene, arylalkylamine N-acetyltransferase gene transcriptions in the rat pineal gland. *Chronobiol Int*. 2007;24(1):9-20.
75. Kennaway DJ, Owens JA, Voultsios A, Boden MJ, Varcoe TJ. Metabolic homeostasis in mice with disrupted Clock gene expression in peripheral tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 Oct;293(4):R1528-37.